

(19) Japanese Patent Office (JP)

(12) Unexamined Patent Publication (A)

(11) Patent Application Publication No.: H3-167474

(43) Publication date: July 19, 1991

(51) Int. Cl. ⁵	Identification Symbol	Office filing No.
G01N 33/543	E	7906-2G
33/53	M	7906-2G
C12O 1/68	A	6807-4B

Examination request: Not requested

Number of claims: 3 (total of 8 pages)

(54) Title of the invention: Immunoassay method

(21) Application No.: Patent Application H1-304607

(22) Application date: November 27, 1989

(72) Inventor: Kazunobu Okano
c/o Central Laboratory, Hitachi, Ltd.
1-280 Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo

(72) Inventor: Satoshi [Other readings possible] Takahashi
c/o Central Laboratory, Hitachi, Ltd.
1-280 Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo

(72) Inventor: Kenji Yasuda
c/o Central Laboratory, Hitachi, Ltd.
1-280 Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo

(72) Inventor: Daizo Tokinaga
c/o Central Laboratory, Hitachi, Ltd.
1-280 Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo

(71) Applicant: Hitachi, Ltd.
4-6 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo

(74) Agent: Patent attorney Katsuo Ogawa and one other

Specifications

1. Title of the invention

Immunoassay method

2. Claims

1. In an immunoassay method having a step for binding a substance to be measured to a water-insoluble carrier either directly or by means of ligands that are immobilized on the said carrier, a step for binding antibodies with labels to the said substance to be measured and a step for measuring the said labels, an

- immunoassay method characterized by the aforesaid labels being a DNA, the said DNA being detected after the amplification of the said DNA by the repetition of steps (1) through (3), the said steps being, (1) a step for the denaturing of DNA into single strands, (2) a step for the complementary binding of oligonucleotides to the single-strand DNA and (3) a step for the synthesis of DNA using DNA polymerase.
2. An immunoassay method characterized by oligonucleotides being the labels for the antibodies and the like, single-strand DNAs complementary to the said oligonucleotides being bound to the said oligonucleotides, oligonucleotides and DNA polymerase being added and then the method of claim 1 being used to amplify the DNAs, the said amplified DNAs then being detected.
 3. An immunoassay method characterized by DNA polymerase being the labels for the antibodies and the like, oligonucleotides and DNA being added and then the method of claim 1 being used to amplify the DNAs, the said amplified DNAs then being detected.

3. Detailed Description of the Invention

Field of Industrial Application

The present invention relates to a method for the immunoassay of biological systems such as peptides, proteins, hormones and toxins in the fields of biochemistry, medical chemistry, microbial technology and molecular biology.

Prior Art

Methods for the detection of biological systems that use immunoassay methods of the prior art are discussed in *Analytical Biochemistry*, 171, 271 (1988) and in the *Journal of Immunological Methods*, 83, 89 (1985). With these methods, a sample solution is added to antibodies that are immobilized on an immunoplate or a glass piece to cause specific binding between the antibodies on the carrier and the substance to be assayed present in the sample solution. After washing away the substances that did not bind, enzyme-labeled antibodies are added to bind the enzyme-labeled antibodies to the substance to be measured present on the carrier and bound with antibodies. After washing away the excessive enzyme-labeled antibodies, enzyme substrates are used to measure the activity of the enzymes on the carrier to detect the targeted substance. Since enzyme-labeled antibodies are used for the detection of the substance to be measured, these methods are referred to as enzyme immunoassays.

Analytical Biochemistry, 171, 271 (1988) describes examples of measuring α -fetoprotein or human IgG using antibodies labeled with inorganic pyrophosphatase (EC.3.6.1.1). Inorganic pyrophosphatase activity is measured by using molybdic acid and malachite green to emit color from the inorganic phosphates produced by the pyrophosphates.

The *Journal of Immunological Methods*, 83, 89 (1985) describes an example where human thyroid-stimulating hormones are measured using antibodies labeled with alkaline phosphatase. Here, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) produced from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) by the effects of alkaline phosphatase is used to drive the enzyme cycle of alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) and diaphorase (EC 1.6.4.3). NAD⁺ is reduced by alcohol dehydrogenase and becomes reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). When NADH is converted back to NAD⁺ by diaphorase, formazan dyes are synthesized from tetrazolium salt. By measuring the formazan dyes that are generated, the quantity of the targeted substance to be measured is measured.

Problems to be Solved by the Invention

With the afore-described prior art, the detection of enzymes labeled with antibodies, etc. is

accomplished by generating dyes, etc. from the substrate using the catalytic effects of the enzymes or replacing the substance produced by the substrate with different dyes and then measuring their extinction or fluorescence. However, these methods of the prior art had the following problems.

(1) With the prior art, if the nonspecific adsorption of the enzyme-labeled substances is kept low, the reaction time of the enzymes can be improved and substances of low concentration can be measured. However, improving the minimum measurement limit by a factor of ten requires that the reaction time be increased by at least a factor of ten, presenting the problem of an extremely long enzyme reaction time. The reason for this is that, with the prior art, the enzymes are used only as catalysts for the production of dyes, etc. from the substrates. Stated differently, even if the reaction were to be performed using grossly excessive amounts of the substrates to maximize the number of enzyme cycles, the quantity of products such as dyes increases only in proportion to the reaction time.

(2) Enzymes are detected by measuring the extinction or the fluorescence intensity of the substances that are produced by the substrates by the effects of the enzymes. Hence, substances with a high absorption coefficient or a strong fluorescence cannot be used as the substrates. Fluorescein, sulforhodamine 101, ethidium bromide and other fluorochromes, for example, cannot be used as the enzyme substrates because of their strong fluorescence.

It is the first object of the present invention to provide an immunoassay method that can detect substances of low concentration in a practical amount of time.

To achieve the aforesaid first object, it is the second object of the present invention to provide an immunoassay method which uses an enzyme detection method that employs dyes with a strong fluorescence such as fluorescein, sulforhodamine 101 or ethidium bromide which could not be easily used in the prior art for the measurement of enzyme activity.

Means for Solving the Problems

The aforesaid first object is accomplished by a step of using DNA or DNA polymerase as labels for the antibodies and then denaturing the DNA to become single strands, a step for the complementary bonding of the single-strand DNAs to oligonucleotides, a step for synthesizing the DNAs using DNA polymerase and amplifying the DNAs by repeating the aforesaid steps.

The aforesaid second object is achieved by using, in the aforesaid method for achieving the first object, oligonucleotides bonded to dyes such as fluorescein so that DNAs introduced with dyes are synthesized, and then measuring the said DNAs. Here, unreacted dye-bonded oligonucleotides can be removed by electrophoresis, ultrafiltration or chromatography. Alternatively, the aforesaid second object is achieved by using a DNA stain such as ethidium bromide to stain the DNA amplified as described in the aforesaid method for achieving the first object.

In the afore-described method for achieving the first object, it is not always necessary to detect the synthesized DNA. Instead, pyrophosphates that are generated during the synthesis of DNA using DNA polymerase may be assayed. What should be noted here is that the reaction using DNA polymerase is usually done at a high temperature, around 70°C. Because of this, during the DNA amplification, DNA polymerase substrates such as ATP and GTP undergo pyrolysis, although minimally, resulting in the nonenzymatic production of pyrophosphates. It is therefore necessary to remove the pyrophosphates after the amplification of DNA, repeat the DNA synthesis at a low temperature and then measure the pyrophosphates that are produced.

Pyrophosphates can be assayed by reacting APS sulfurylase in the presence of APS (adenosine 5'-phosphosulfate) after the removal of dATP, etc. and converting the pyrophosphates into adenosine 5'-3 phosphate (ATP). When luciferase is reacted with the ATP that is produced in the presence of O₂ and luciferin, adenosine 5'-1 phosphate, CO₂ and pyrophosphate are produced along with the emission of

luminescence. The amount of pyrophosphates can be determined by measuring the luminescence intensity.

Operation

After reacting the substance to be measured that is immobilized on a carrier with antibodies, etc. labeled with DNA, the unreacted DNA labeled antibodies are removed by washing to leave behind on the carrier the DNA-labeled antibodies in an amount corresponding to that of the substance to be measured. [The DNA-labeled antibodies] are heated in the presence of an excessive amount of oligonucleotides to dissociate the DNAs into single strand DNAs. Next, when the temperature is lowered, DNA is re-bonded with the oligonucleotides. If, at this time, DNA polymerase is present, DNA that is complementary to the single strand DNA is synthesized using the oligonucleotides as the origin.

The respective temperatures for the dissociation of DNA into single strands, the re-bonding of oligonucleotides and the DNA polymerase reaction are different. This means that if the DNA polymerase is heat-stable, the cycle involving the dissociation of DNA, re-bonding of oligonucleotides and synthesis of DNA can be repeated simply by raising and lowering the temperature. Each cycle synthesizes one complementary strand that corresponds to each double-strand DNA. This means that under ideal conditions, the amount of DNA doubles after each cycle. Repeating the cycle results in a geometric increase in the amount of DNA. The amount of amplified DNA depends on the amount of DNAs labeling the antibodies, and the amount of DNAs labeling the antibodies depends on the amount of the substance to be measured that is trapped on the carrier. Therefore, by determining the amount of amplified DNA, the amount of the substance to be measured can be determined.

The case where DNA polymerase is used to label the antibodies is described next. The antibodies labeled with DNA polymerase bond with the substance to be measured that is immobilized on a carrier. When DNA and oligonucleotides are added and the cycle of DNA dissociation, bonding of single-strand DNA with oligonucleotides and DNA synthesis is repeated, the amount of DNA increases. The reaction proceeds in the presence of excessive amounts of DNA and oligonucleotides as compared to the amount of DNA polymerase. This means that the amount of DNA that is synthesized for each cycle is constant. The amount of DNA that is amplified depends on the amount of DNA polymerase that labels the antibodies, and [the amount of] DNA polymerase depends on the amount of the substance to be measured that is trapped on the carrier. Therefore, by determining the amount of amplified DNA, the amount of the substance to be measured can be determined.

An example of a method for detecting the amplified DNAs involves first removing the unreacted oligonucleotides by electrophoresis and then measuring the fluorescence intensity after staining the DNA with a fluorescent stain such as ethidium bromide. Or, if the DNA is synthesized using oligonucleotides bound with fluorescent dyes, the amplified DNAs can be made to be fluorescent. The amount of DNA, that is, the amount of the substance to be measured, can be determined by measuring the fluorescence intensity after removing the unreacted oligonucleotides bound with fluorescent dyes. Since the molecular weight of oligonucleotides bound with fluorescent dyes is less than that of the synthesized DNAs, the oligonucleotides can be easily removed by electrophoresis, ultrafiltration, chromatography or propanol extraction.

The amount of the substance to be measured can also be determined by assaying the pyrophosphates that are generated when the DNA is synthesized instead of detecting the DNA that is synthesized. The DNA polymerase has the effect of releasing one pyrophosphate every time one DNA base is bound during DNA synthesis. This means that if the DNA polymerase is made to react at a low temperature after first removing the pyrophosphates from the DNA that was amplified by the repetition of the synthesis cycle, pyrophosphates are produced in an amount that corresponds to the amount of DNA. Since this allows the amount of DNA that was synthesized to be determined from the amount of pyrophosphates that are produced, the amount of the substance to be measured can be determined.

Embodiments

Embodiments of the present invention are described next.

Embodiment 1

[The inventors] have confirmed that the substance to be measured can be detected by the amplification of DNA using DNA-labeled antibodies. Human α -fetoprotein with a concentration of 10^{-13} M was used as the substance to be measured. Isotope-labeled oligonucleotides were used so that a scintillation counter could be used for the detection. The materials used for the measurement are described first.

(1) Carrier

With this embodiment, the carrier was glass beads on which anti-human α -fetoprotein antibodies had been immobilized. The method of preparation is described next.

Glass beads with a diameter of 2 mm and a rough surface were treated with 3-(2-aminoethyl aminopropyl)-trimethoxy silane to introduce amino groups to the surface. Reaction with glutaraldehyde was used to introduce aldehyde groups using the amino groups. After reacting the antibodies, the unreacted aldehyde groups were inactivated with ethanolamine. [The glass beads] were stored in a buffer solution (hereafter "PBS") with a pH of 7.4 comprising 50 mM phosphates and 0.15 M NaCl containing 50 mg/mol bovine serum albumin and 0.01% sodium ethyl mercury salicylate.

(2) Oligonucleotides

Two types of oligonucleotides with the following structures consisting of 20 bases complementarily bonded to human mitochondria DNA were synthesized using the phosphoramidite method.

I: 5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3'

II: 5'-ACAGTTTCATGCCCCATCGTC-3'

(3) DNA

A fragment derived from human mitochondria DNA and comprising 121 base pairs consisting of a sequence interposed between 5'-ACAGTTTCATGCCCCATCGTC- and -CTGTAAAGCTAACTTAGCAT-3' and its complementary strand was used.

(4) DNA polymerase

Taq DNA polymerase

(5) Isotope-labeled oligonucleotides

The aforesaid oligonucleotides I and II with ^{32}P introduced to the 5' end were obtained following the procedure used by Maniatis, T. et al in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" ((1982), p. 122, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

(6) DNA-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies

The method of preparation is described below.

The aforesaid oligonucleotides were synthesized using the usual phosphoramidite method. At the final stage of the reaction, amino-phosphorous 72 (manufactured by Applied Biosystems) was used to introduce aminohexyl groups to the 5' end of the oligonucleotides in a phosphate form. The aminohexylated oligonucleotides were refined by gel filtration in a Sephadex G10 column. This was followed by a reaction with N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a bifunctional reactive reagent. The unreacted bifunctional reactive reagent was removed in a Sephadex G10 column to obtain oligonucleotides introduced with pyridyldithio groups. After reacting the anti-human α -fetoprotein antibodies with 2x moles of N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, sulfide groups were introduced by reduction with dithiothreitol. The anti-human α -fetoprotein antibodies introduced with sulfide groups

were refined in a Sephadex G25 column.

The oligonucleotides introduced with pyridyldithio groups and prepared in the above-described manner and the anti-human α -fetoprotein antibodies with sulfide groups introduced were mixed in a molar ratio of 2:1 and allowed to react for 24 hours at room temperature. Unreacted oligonucleotides were removed with Sephadex G25. Anti-human α -fetoprotein antibodies with oligonucleotides bound to them were obtained in the above manner.

Either of the two types of oligonucleotides mentioned above may be used.

Next, single-strand DNA derived from human mitochondria was complementarily bonded to the antibodies bonded with oligonucleotides. This was followed by a reaction with DNA polymerase 1 Klenow fragment (10 units/ml) for 30 minutes in the presence of 200 μ M each of dTTP, dATP, dGTP and dCTP. The above operations provided anti-human α -fetoprotein antibodies bonded with human mitochondria derived DNA fragments each comprising 121 base pairs. Lastly, the DNA-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies were refined by gel filtration in a Sephacryl S-300 column.

Next, the following experiment will be used as a basis for showing that human α -fetoproteins can be measured by the amplification of DNA labeling the antibodies. The change in intensity of the signal that is obtained with the number of DNA amplification reactions that is performed is described here.

One glass bead on which anti-human α -fetoprotein antibodies had been immobilized was placed in a vessel. 100 μ l of a solution containing 10^{-13} M of human α -fetoprotein were added and stirred for 30 minutes. After washing with a PBS containing 10 mg/ml of bovine serum albumin, 100 μ l of DNA-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies (antibody concentration of 10 nM) prepared in the above-described manner were added and stirred for 3 hours. This was followed by washing first with a PBS containing 10 mg/ml of bovine serum albumin and then with a 10 mM tris hydrochloric acid buffer of pH 8.3 containing 50 mM of KCl and 1.5 mM of $MgCl_2$.

The above operations resulted in binding DNA-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies to the human α -fetoproteins trapped on the glass bead.

This was followed by DNA amplification. 100 μ l of buffer solution for DNA synthesis containing 2.5 units of Taq DNA polymerase, dATP, dTTP, dGTP and dCTP each with a concentration of 200 μ M and two types of isotope-labeled oligonucleotides (1 μ M) were added. The said buffer solution for DNA synthesis is a 10 mM tris hydrochloric acid buffer solution of pH 8.3 and containing 50 mM of KCl, 1.5 mM of $MgCl_2$ and 0.01% gelatin.

Next, the reaction cycle described below was repeated 1 to 34 times.

- (1) Maintain 94°C for 1 minute to create single-strand DNAs.
- (2) Maintain 55°C for 2 minutes to complementarily bond the oligonucleotides to the single-strand DNAs.
- (3) Maintain 72°C for 2 minutes for DNA synthesis.

The reaction solution was subjected to electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel. The gel band containing the amplified DNA was removed, and the radioactivity derived from ^{32}P was measured with a liquid scintillation counter.

FIG. 1 shows the measured curve depicting the change in radioactivity with the number of reaction cycles.

The results show that the specific radioactivity increased by 1.6-fold for each additional cycle for the range of 10 to 26 reaction cycles. This shows that repeating the reaction n -times amplifies the amount of DNA by 1.6^n times. This is because the DNA that is obtained in one synthesis reaction serves as the template for the next synthesis reaction resulting in the reactions to proceed in a chain reaction-like manner.

Each DNA synthesis reaction takes approximately 10 minutes including the time required for raising and lowering the temperature. In other words, the amount of DNA increases by 1.6-fold every 10 minutes.

With immunoassay methods of the prior art, antibodies directly labeled with enzymes and isotopes are used for the detection. With an enzymatic reaction, the amount of reaction products increases proportionately with time. The same is true when isotope-labeled antibodies are used, and the count increases in proportion to the time spent measuring the radioactivity. In either case, the intensity of the signals that are obtained increases proportionately with time. Since the present invention uses a DNA synthesis reaction wherein the reaction products increase in a chain reaction-like manner, a beneficial effect is that substances present in lesser amounts can be detected in short amounts of time as compared to the prior art. For example, with the method of the prior art which measures fluorescence using peroxidase-labeled antibodies and H_2O_2 and p-hydroxyphenyl propionate as substrates, the minimum detectable limit was 10^{-12} to 10^{-11} M of human α -fetoproteins (sample solution quantity of 100 μ l). This result was roughly the same even when antibodies labeled with ^{131}I was used.

With the present invention, repeating the DNA synthesis reaction by 20 to 30 times allows 10^{-13} M of human α -fetoproteins (sample solution quantity of 100 μ l) to be detected with margin to spare, thus being a method that is of a sufficiently higher sensitivity than the prior art.

In the present embodiment, the method used for labeling the antibodies with DNA was to first bind oligonucleotides to the antibodies and then using DNA polymerase I Klenow fragment to synthesize the DNAs on the antibodies. Similar results were obtained when, instead of this method, DNAs with an aminoethyl groups introduced to the 5' end on one of the strands were synthesized and bound to the antibodies using the method employed in the afore-described embodiment.

Results similar to those of the afore-described embodiment were obtained when the following method was used with oligonucleotide-labeled antibodies instead of DNA-labeled antibodies.

First, oligonucleotide-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies were reacted with human α -fetoproteins that were trapped on a glass bead. Next, single-strand DNAs were complementarily added to the oligonucleotides and left standing for 5 minutes at 45°C. Unreacted DNA was removed by washing. The above procedure binds the DNA to the oligonucleotides labeling the antibodies. Then oligonucleotides and Taq DNA polymerase were added in a similar manner as in the afore-described embodiment to repeat the DNA amplification reaction.

The afore-described embodiment uses DNA as the label for the antibodies, but when the DNA amplification reaction was performed using anti-human α -fetoprotein antibodies labeled with Taq DNA polymerase, human α -fetoprotein could still be detected. However, unlike the case where DNA-labeled antibodies were used, the amplification factor of the DNAs decreased as the DNA amplification reaction was repeated.

With the afore-described embodiment, the radioactivity incorporated in the DNA by the DNA amplification reaction is measured to detect the anti-human [sic] α -fetoproteins. However, similar results were obtained when pyrophosphates that are generated when DNA is synthesized were measured.

Embodiment 2

Using fluorescent dye-labeled oligonucleotides, human α -fetoproteins were detected by measuring the dyes that were incorporated in the amplified DNAs. The materials used for the measurement are described first.

(1) Carrier

Glass beads on which anti-human α -fetoprotein antibodies had been immobilized were prepared in

the same manner as in Embodiment 1.

(2) Oligonucleotides

The same two types of oligonucleotides as in Embodiment 1 were prepared.

(3) DNA

The same DNA as in Embodiment 1 was used.

(4) DNA polymerase

Taq DNA polymerase

(5) Dye-labeled oligonucleotides

Fluorescein prepared as follows was used as the dye.

Following the method of Embodiment 1, two types of oligonucleotides with aminohexyl groups introduced to the 5' end were obtained. At a pH of 8.5, 10x moles of fluorescein isothiocyanate were added and allowed to react for 6 hours at room temperature. Unreacted fluorescein and their decomposition products were removed in a Sephadex G25 column. The oligonucleotides labeled with fluorescein were obtained in the manner described above.

The method for the measurement of human α -fetoprotein is described next. With the present embodiment, the fluorescence intensity that was produced for human α -fetoproteins of different concentrations was measured.

First, one glass bead on which anti-human α -fetoprotein antibodies had been immobilized was placed in a vessel. 100 μ l of a solution containing 0 to 10^{-12} M of human α -fetoprotein were added and stirred for 30 minutes. After washing with a PBS containing 10 mg/ml of bovine serum albumin, 100 μ l of the DNA-labeled human [sic] α -fetoprotein antibodies (antibody concentration of 10 nM) prepared in the manner described above for Embodiment 1 were added and stirred for 3 hours. This was followed by washing first with a PBS containing 10 mg/ml of bovine serum albumin and then with a 10 mM tris hydrochloric acid buffer of pH 8.3 containing 50 mM of KCl and 1.5 mM of $MgCl_2$. The above operations resulted in binding the DNA-labeled anti-human α -fetoprotein antibodies to the human α -fetoproteins trapped on the glass bead.

This was followed by DNA amplification. 100 μ l of buffer solution for DNA synthesis containing 2.5 units of Taq DNA polymerase, dATP, dTTP, dGTP and dCTP each with a concentration of 200 μ M and two types of fluorescein-labeled oligonucleotides (1 μ M) were added.

Next, the reaction cycle described below was repeated 30 times.

- (1) Maintain 94°C for 1 minute to create single-strand DNAs.
- (2) Maintain 55°C for 2 minutes to complementarily bond the oligonucleotides to the single-strand DNAs.
- (3) Maintain 72°C for 2 minutes for DNA synthesis.

The reaction solution was subjected to electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel. The band with the amplified DNA was irradiated with 488 nm argon laser, and the 520 nm fluorescence that was emitted was measured.

FIG. 2 shows the fluorescence intensity that was obtained from human α -fetoprotein of different concentrations. FIG. 2 shows that DNA amplification reaction using fluorescein-labeled oligonucleotides allows human α -fetoprotein to be measured with a good sensitivity.

In the above-described embodiment, fluorescein was used to label the oligonucleotides, but similar results were obtained when 4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol, 2-oxa-1, 3-diazol-4-2-sulfonic acid, sulforhodamine 101 and the like were used instead.

In the above embodiment, fluorescein-bound DNA was synthesized and its fluorescence measured. However, similar results were obtained when the DNA was detected by first removing unreacted oligonucleotides by electrophoresis and then a fluorescent stain such as ethidium bromide was used to stain the DNA.

Effect of the Invention

With the present invention, because DNA amplification reaction is used, the strength of the signal that is obtained with respect to the reaction time increases geometrically. Furthermore, while the use of fluorescein and the like for measuring enzyme activity had been difficult in the past, an effect [of the present invention] is that, since dyes with a high fluorescence efficiency or high specific extinction coefficient can be used, substances of low concentration can be measured in a short amount of time.

4. Brief Description of the Figures

FIG. 1 is a graph showing the signal values that were measured as a function of the number of DNA synthesis cycles for one embodiment of the present invention. FIG. 2 is a graph showing the measurements obtained with human α -fetoprotein in another embodiment of the present invention.

Agent: Patent attorney Katsuo Ogawa

FIG. 1

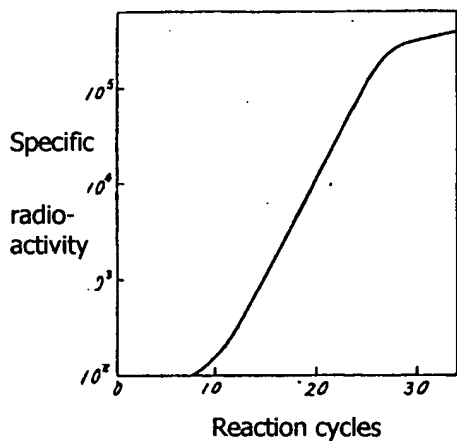
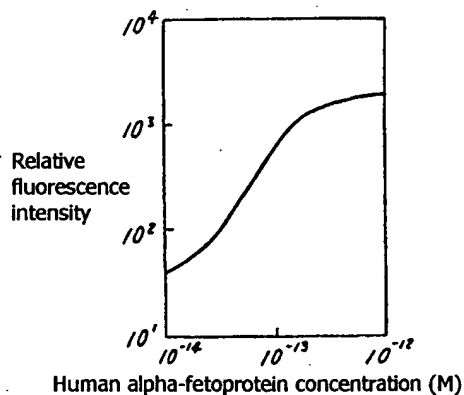


FIG. 2



⑫ 公開特許公報(A) 平3-167474

⑤ Int. Cl.⁵

G 01 N 33/543

33/53

// C 12 Q 1/68

識別記号

E

M

A

庁内整理番号

7906-2G

7906-2G

6807-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)7月19日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑭ 発明の名称 免疫学的測定法

⑯ 特 願 平1-304607

⑰ 出 願 平1(1989)11月27日

⑱ 発 明 者 岡 野 和 宣 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 高 橋 智 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 保 田 健 二 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 発 明 者 時 永 大 三 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉒ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉓ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫学的測定法

2. 特許請求の範囲

1. 水に不溶性の担体に固定化したりガンドを介して、又は該担体に直接被測定物質を結合させる工程、該被測定物質に標識物を結合した抗体等の物質を結合させる工程、及び標識物を測定する工程を有する免疫学的測定法において、上記標識物がDNAで、該DNAと該DNAに相補的なオリゴヌクレオチドとDNAポリメラーゼの共存下で、(1) DNAを変性せしめ一本鎖とする工程、(2) 一本鎖DNAとオリゴヌクレオチドを相補的に結合せしめる工程、(3) DNAポリメラーゼによりDNAを合成する工程を設け、(1) から(3) の工程を繰り返すことにより該DNAを増幅せしめ、該増幅DNAを検出することを特徴とする免疫学的測定法。

2. 抗体等の標識物がオリゴヌクレオチドで、該オリゴヌクレオチドに相補的な一本鎖DNAを

結合させ、さらにオリゴヌクレオチドとDNAポリメラーゼを加えた後、請求項1の方法に従いDNAを増幅せしめ、該増幅DNAを検出することを特徴とする免疫学的測定法。

3. 抗体等の標識物がDNAポリメラーゼで、オリゴヌクレオチドとDNAを加えた後、請求項1の方法に従いDNAを増幅せしめ、該増幅DNAを検出することを特徴とする免疫学的測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、生化学、医化学、微生物工学、分子生物学の分野における、ペプチド、蛋白質、ホルモン、トキシン等の生体関連物質の免疫学的測定法に関する。

〔従来の技術〕

従来の免疫学的な手法を用いた生体物質の検出法については、アナリティカル バイオケミストリー、171, 271 II(1988) (Analytical Biochemistry, 171, 271 (1988)) であ

るいはジャーナル オブ イムノロジカル メソ
 ヌズ 83, 89頁 (1985) (Journal of
 Immunological Methods, 83, 89 (1985))
 において論じられている。これらの方法は、まず
 抗体を固定化したイムノプレートやガラス片など
 の担体に試料溶液を添加し、試料溶液中の測定対
 象物質を担体上の抗体に特異的に結合させる。結
 合しない物質を洗い流した後、酵素標識抗体を添
 加し、担体上の抗体を結合した測定対象物質に酵
 素標識抗体を結合させる。過剰の酵素標識抗体を
 洗浄した後に酵素の基質を用いて担体上の酵素活
 性を測定することで目的とする物質を検出する。
 この方法は目的とする測定対象物質の検出に酵素
 を標識した抗体を用いるため、酵素免疫測定法あ
 るいはエンザイムイムノアッセイと呼ばれている。

アナリティカル バイオケミストリー 171,
 271頁 (1988) では、イノーガニック ピ
 ロホスファターゼ (EC.3.6.1.1) を標識し
 た抗体を用いて、 α -フェトプロテインやヒト
 IgGを測定した例が記載されている。イノーガ

ニック ピロホスファターゼ活性は、ピロリン酸
 より生成した無機リン酸をモリブデン酸とマラカイ
 トグリーンで発色させることにより測定している。

また、ジャーナル オブ イムノロジカル メ
 ソズ、83, 89 (1985) では、アルカリ
 ホスファターゼを標識した抗体を用いてヒト甲状
 腺刺激ホルモンを測定した例が記載されている。
 ここではアルカリホスファターゼの作用により、
 ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ
 ン酸 (NADP⁺) より生成したニコチンアミドアデ
 ニンジヌクレオチド (NAD⁺) を用いてアルコ
 ールデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.1) とジ
 ホラーゼ (EC1.6.4.3) の酵素サイクルを駆
 動させている。NAD⁺ はアルコールデヒドロゲ
 ナーゼにより還元型ニコチンアミドアデニンジ
 スクレオチド (NADH) に還元される。NADH
 がジホラーゼによりNAD⁺ にもどる時に、テ
 トラゾリウム塩からホルマザン色素を合成する。
 生成したホルマザン色素を測定することにより、
 目的とする測定対象物質の量を測定している。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記従来技術は、抗体等を標識した酵素の検出
 において、酵素の触媒作用を用いて基質から色素
 等を生成し、あるいは、基質から生成した物質を
 さらに他の色素におきかえて、その吸光度や蛍光
 を測定するが、これらの従来技術には以下の問題
 点があつた。

(1) 従来技術では、酵素標識物質の非特異的吸着
 が低くおさえられていれば、酵素の反応時間を
 長くすることで、より低濃度の物質が測定でき
 る。しかし、たとえば、測定下限を1/10に
 しようとするに反応時間を最低でも10倍にし
 なければならない、酵素の反応時間が非常に長
 くなるという問題があつた。これは、従来技術で
 は、酵素は単に基質から色素等を生成させる触
 媒として使用されるためである。言いかえると、
 基質を大過剰量用いて酵素の回転数が最大とな
 る条件で反応を行わせても、色素等の生成物の
 量は反応時間に比例して増加するだけであるか
 らである。

(2) 酵素の検出は、酵素の作用により基質から生
 成した物質の吸光度や蛍光強度を測定すること
 による。よつて基質自体が大きな吸光係数を持
 つたり強い蛍光を発する物質は基質として使用
 できない。たとえば、フルオレツセインやスル
 ホローダミン101やエチジウムブロマイドな
 どの蛍光色素は、それ自体が強い蛍光を持つ
 て酵素の基質として使用することはできない。
 本発明の第1の目的は、低濃度の物質を実用的
 な時間内に検出できる免疫学的検出法を提供す
 ることにある。

本発明の第2の目的は、上記第1の目的を達成
 するために、フルオレツセインやスルホローダ
 ミン101やエチジウムブロマイドなど、従来酵
 素の活性測定には使用が難しかつたが、強い蛍
 光を発する色素を用いることのできる酵素の検
 出法を導入した免疫学的測定法を提供すること
 にある。

〔課題を解決するための手段〕

上記第1の目的は、抗体等の標識物質にDNA
 あるいはDNAポリメラーゼを用いて、DNAを

変性させ一本鎖とする工程、一本鎖DNAとオリゴヌクレオチドを相補的に結合させる工程、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する工程を導入し、さらにこれらの工程を繰り返しDNAを増幅させることにより達成される。

上記第2の目的は、上記第1の目的の達成法においてフルオレツセイン等の色素を結合したオリゴヌクレオチドを用いることにより、色素を導入したDNAを合成し、これを測定することで達成される。ここで、未反応の色素結合オリゴヌクレオチドは電気泳動や限外濾過あるいはクロマトグラフィにより取り除くことができる。また、上記第2の目的は、上記第1の目的の達成法において増幅したDNAをエチジウムブロマイド等のDNA用染料を用いて染色することにより達成される。

上記第1の目的を達成する方法においては、必ずしも合成したDNAを検出しなくてもよく、DNAポリメラーゼを用いてDNAを合成する時に生成するピロリン酸を定量してもよい。ここで特

に留意しなければならない点は、DNAポリメラーゼを用いた反応は通常70℃前後の高温で行なわれることである。このためDNAの増幅中に、DNAポリメラーゼの基質であるATPやGTPなどは、わずかながら熱分解を受け、非酵素的にピロリン酸を生成してしまう点である。従って、DNAの増幅を行なった後に、まずピロリン酸を取り除き、再度低温でDNA合成反応を行わせて生成させたピロリン酸を測定する必要がある。

ピロリン酸の定量法としては、たとえば、dATPなどを除いた後にアデノシン 5'-ホスホスルフェート(APS: Adenosine 5'-phosphosulfate)の存在下でAPSスルフィラーゼ(APS sulfurylase)を反応させてピロリン酸をアデノシン 5'-3'リン酸(ATP)に変換する。生成したATPにO₂とルシフェリンの存在下でルシフェラーゼを作用させると、アデノシン 5'-1'リン酸とCO₂とピロリン酸を生成すると同時に発光する。この発光強度を測定することによりピロリン酸の量を知ることができる。

〔作用〕

担体上に固定化した被測定物質に対してDNAを標識した抗体等を反応させた後、未反応のDNA標識抗体を洗浄して除くと、被測定物質の量に応じた量のDNA標識抗体が担体上に残る。過剰量のオリゴヌクレオチドの共存下で加熱してDNAを解離させて一本鎖とする。次に温度を下げると、一本鎖になったDNAとオリゴヌクレオチドが再結合する。この時DNAポリメラーゼが存在するとオリゴヌクレオチドを基点として一本鎖DNAと相補的なDNAが合成される。

DNAを一本鎖に解離させる温度と、オリゴヌクレオチドが再結合する温度と、DNAポリメラーゼが働く温度はそれぞれ異なる。よってDNAポリメラーゼが耐熱性であれば温度を上下させるだけでDNAの解離、オリゴヌクレオチドの結合、DNAの合成のサイクルをくり返すことができる。1回のサイクルで、2本鎖のDNAそれぞれに対応する相補鎖が1本ずつ合成される。よって、理想的には1回のサイクルでDNAの量は2倍にな

る。サイクルをくり返せば、DNAの量は幾何的に増加する。増幅されたDNAの量は抗体を標識しているDNAに依存し、抗体を標識していたDNAは担体上に捕捉された被測定物質の量に依存している。よって、増幅されたDNAの量を知ることができれば、もとの被測定物質の量を知ることができる。

抗体の標識にDNAポリメラーゼを用いた場合について説明する。担体上に固定化した被測定物質に対しDNAポリメラーゼを標識した抗体が結合する。DNAとオリゴヌクレオチドを加え、DNAの解離、1本鎖DNAとオリゴヌクレオチドの結合、DNAの合成のサイクルをくり返すと、DNAの量が増加する。ここでは、DNAポリメラーゼの量に比べ、DNAやオリゴヌクレオチドが過剰量存在する条件下で反応が進行する。このため、1回のサイクルで合成されるDNAの量は一定量となる。増幅されたDNAの量は抗体を標識しているDNAポリメラーゼの量に依存し、DNAポリメラーゼは担体上に捕捉された被測定

物質の量に依存する。よつて、増幅されたDNAの量を知ることができれば、もとの被測定物質の量を知ることができる。

増幅したDNAを検出する方法としては、たとえば電泳泳動により未反応のオリゴヌクレオチドを除いた後、エチジウムブロマイドのようなDNAの蛍光染料を用いて染色し、蛍光強度を測定することにより可能である。あるいは、蛍光色素を結合したオリゴヌクレオチドを用いてDNAを合成すれば、増幅したDNAに蛍光を持たすことができる。未反応の蛍光色素を結合したオリゴヌクレオチドを除去した後、蛍光強度を測定することにより、DNAの量、すなわち被測定物質の量を知ることができる。蛍光色素を結合したオリゴヌクレオチドは合成されたDNAに比べ、低分子量であるため、電気泳動や限外ろ過あるいはプロパノール抽出やクロマトグラフィーにより簡単に除去することができる。

合成したDNAを検出する代りに、DNAを合成する時に生成するピロリン酸を定量しても被測定

物質の量を知ることができる。DNAポリメラーゼの作用により、DNAを合成する時には、DNAの塩基が1個結合するとピロリン酸1個が放出される。よつて、合成サイクルをくり返して増幅したDNAから一度ピロリン酸を除いた後に、再度低温でDNAポリメラーゼを作用させると、DNAの量に応じたピロリン酸が生成する。よつてピロリン酸の量を知ることができれば合成されたDNAの量がわかるので、被測定物質の量を知ることができる。

〔実施例〕

以下本発明の実施例を説明する。

実施例1

DNAを標識した抗体を用いて、DNAを増幅することで被測定物質が検出できることを確認した。被測定物質としては 10^{-12} Mの濃度のヒト α -フェトプロテインを用いた。ここでは検出にシンチレーションカウンターを使用できるように、アイソトープラベルしたオリゴヌクレオチドを用いた。

まず測定に使用する材料について説明する。

(1) 担体:

本実施例の担体としては、抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を固定化したガラスビーズを用いた。以下にその調製方法を示す。

直径2mmで表面が粗面状のガラスビーズを3-(2-アミノエチルアミノプロピル)-トリメトキシシランで処理し、表面にアミノ基を導入した。グルタルアルデヒドを反応させ、アミノ基を介してアモデヒド基を導入した。抗体を反応させた後、未反応のアルデヒド基をエタノールアミンで不活性化した。50mg/ml牛血清アルブミンと0.01%エチル水銀サリチル酸ナトリウムを含む0.15M NaClと50mM 磷酸からなるpH7.4の緩衝液(以下PBSと書く)中で保存した。

(2) オリゴヌクレオチド:

ヒトミトコンドリアDNAに相補的に結合する20塩基よりなる以下の構造の2種類のオリゴヌクレオチドを、ホスホアミダイド法で合成

した。

I: 5' -ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3'

II: 5' -ACAGTTTCATGCCCATCGTC-3'

(3) DNA:

ヒトミトコンドリアDNA由来で、

5' -ACAGTTTCATGCCCATCGTC-と

-CTGTAAAGCTAACTTAGCAT-3'

の構造ではさまれる部分とその相補鎖で、

121塩基対よりなるフラグメントを用いた。

(4) DNAポリメラーゼ:

Taq DNAポリメラーゼ

(5) アイソトープラベルしたオリゴヌクレオチド:

“モレキュラークローニング: アラボラトリーマニュアル”(1982)p122 コールドスプリングハーバーラボラトリー, コールドスプリングハーバー, ニューヨーク

(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)P122 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.) 記載のマニアティスら (Maniatis, T. et al) の方法に従い、

5' 末端に、 ^{32}P を導入した前記のオリゴヌクレオチド I、及び、II を得た。

(6) DNA を標識した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体：

以下に調製法を示す。

常法に従い、ホスホアミダイド法を用いて前記オリゴヌクレオチドを合成した。反応の最終段階においてアミノリン72 (アプライド バイオシステムズ製) を用いて、オリゴヌクレオチドの5' 末端に磷酸エステルの型でアミノヘキシル基を導入した。アミノヘキシル化したオリゴヌクレオチドは、セファデックス G 10 カラムを用いたゲル濾過で精製した。次に二価反応性試薬である、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオン酸を反応させた。未反応の二価反応性試薬はセファデックス G 10 カラムを用いて除き、ピリジルジチオ基を導入したオリゴヌクレオチドを得た。抗ヒト α -フェトプロテイン抗体に2倍モルのN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)

プロピオン酸を反応させた後、ジチオスレイトールで還元することでスルフィド基を導入した。セファデックス G 25 カラムを用いてスルフィド基を導入した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を精製した。

上記方法により調製したピリジルジチオ基を導入したオリゴヌクレオチドと、スルフィド基を導入した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を、2:1 のモル比で混合し、室温で24時間反応させた。セファデックス G 25 を用いて未反応のオリゴヌクレオチドを除いた。以上の操作でオリゴヌクレオチドが結合した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を得た。

オリゴヌクレオチドは前記した2種類のいずれでもよい。

次に、オリゴヌクレオチドが結合した抗体に、ヒトミトコンドリア由来の一本鎖 DNA を相補的に結合させた。次に、DNA ポリメラーゼ I クレノーフラグメント (10 ユニット/m μ) と各 200 μM の d T T P と d A T P と d G T P と

d C T P の共存下で30分間反応させた。以上の操作でヒトミトコンドリア由来の121塩基対よりなる DNA フラグメントを結合した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を得た。最後にセファクリル S-300 カラムを用いたゲル濾過で、DNA を標識した抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を精製した。

次に、抗体を標識している DNA を増幅することでヒト α -フェトプロテインが測定できることを以下の実験にもとづいて示す。ここでは、DNA の増幅反応の回数に対して、得られる信号強度がどのように変化するかを示した。

抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を固定化したガラスビーズ1個を容器にとり、 10^{-10}M のヒト α -フェトプロテインを含む溶液100 μL を加え、30分間攪拌した。10 mg/m μ 牛血清アルブミンを含む P B S で洗浄した後、上記手法により調製した DNA 標識抗ヒト α -フェトプロテイン抗体 (抗体濃度として10 nM) 100 μL を加え、3時間攪拌した。10 mg/m μ 牛血清

アルブミンを含む P B S、続いて、50 mM K C l と 1.5 mM M g C l $_2$ を含む p H 8.3 の 10 mM トリス塩酸緩衝液で洗浄した。

以上の操作でガラスビーズ上に捕捉したヒト α -フェトプロテインに対し、DNA 標識抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を結合させた。

次に、DNA の増幅を行なった。2種類のアイソトープラベルしたオリゴヌクレオチド (1 μM) と各 200 μM の濃度の d A T P, d T T P, d G T P, d C T P と 2.5 ユニットの T a q DNA ポリメラーゼを含む DNA 合成用緩衝液 100 μL を加えた。ここで、上記 DNA 合成用緩衝液とは 50 mM の K C l と 1.5 mM の M g C l $_2$ と 0.01% ゼラチンを含む p H 8.3 の 10 mM トリス塩酸緩衝液のことである。

次に以下の反応サイクルを1~34回くり返した。

- (1) 94℃に1分間保ち、DNA を一本鎖にする。
- (2) 55℃に2分間保ち、一本鎖 DNA にオリゴヌクレオチドを相補的に結合させる。

(3) 72℃で2分間保ち、DNAを合成させる。

反応液を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。増幅したDNAバンドの部分を含むゲルを切り出し、液体シンチレーションカウンターで³²P由来の放射活性を測定した。

第1図は反応サイクルの回数により放射活性がどのように変化するかを示す測定曲線である。

その結果、反応回数が10回から26回の範囲では、反応回数を1回増すごとに得られる比放射活性は1.6倍になることがわかった。このことは、反応をn回くり返すと、DNAの量が1.6ⁿ倍に増幅されていることを示している。これは、1回の合成反応で得られたDNAが、次の合成反応の鋳型として使用されることにより、連鎖反的に反応が進行するためである。

1回のDNA合成反応は、温度の上下に必要な時間を含めて約10分間である。よって10分間ごとにDNAの量は1.6倍となる。

ところで従来の免疫的測定法では、酵素やアイソトープを直接標識した抗体を検出に用いる。酵

素の反応では、反応生成物の量は時間に比例して増加する。アイソトープラベルした抗体を用いる場合も同じで、放射活性の測定時間に比例してカウント数が多くなる。いずれの場合も、得られる信号強度は時間に比例して大きくなるだけである。本発明では、反応生成物が連鎖反的に増えるようなDNA合成反応を用いるため、従来の方法に比べてより少ない物質を短時間で検出できる効果がある。たとえば、ペルオキシダーゼを標識した抗体と、H₂O₂とp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸を基質として用いて、蛍光を測定する従来法では、10⁻¹²~10⁻¹¹Mのヒトα-フェトプロテイン(試料液量100μl)が検出下限であった。また、この結果は、¹²⁵Iを標識した抗体を用いてもほとんど同じ結果であった。

本発明を用いれば、DNA合成反応を20~30回くり返すことにより10⁻¹²Mのヒトα-フェトプロテイン(試料液量100μl)を余裕をもつて検出できるので、従来法より十分高感度な方法である。

本実施例においては、抗体にDNAを標識する方法として、まず、オリゴヌクレオチドを抗体に結合させ、DNAポリメラーゼIクレノーフラグメントを用いて抗体上にDNAを合成する方法を採用した。この他に、一方の鎖の5'末端にアミノヘキシル基を導入したDNAを合成し、これを上記実施例の方法にしたがって抗体に結合させた物でも同様の結果が得られた。

また、DNAを標識した抗体の代りに、オリゴヌクレオチドを標識した抗体を用いても以下の手法を用いることで上記実施例と同様の結果が得られた。

まずガラスビーズ上に捕捉したヒトα-フェトプロテインにオリゴヌクレチオド標識抗ヒトα-フェトプロテイン抗体を反応させる。次に、オリゴヌクレチオドに相補的に一本鎖DNAを加え、45℃で、5分間放置する。未反応のDNAを洗浄により除く。以上の方法で抗体に標識したオリゴヌクレチオドにDNAが結合する。以後は、上記実施例と同様に、オリゴヌクレチオドとTaq

DNAポリメラーゼを加えてDNA増幅反応をくり返す。

上記実施例では抗体の標識物にDNAを用いているが、Taq DNAポリメラーゼを標識した抗ヒトα-フェトプロテイン抗体を用いてDNA増幅反応を行わせても、ヒトα-フェトプロテインを検出できた。しかし、DNA標識抗体を使用した場合と異なり、DNA増幅反応の回数を重ねるにつれてDNAの増幅率は低下した。

上記実施例では、DNA増幅反応でDNAに取り込まれた放射活性を測定することで、抗ヒトα-フェトプロテインを検出しているが、DNAを合成する時に生じるピロリン酸を測定しても同様な結果が得られた。

実施例2

蛍光色素標識したオリゴヌクレチオドを用いて、増幅したDNAに取り込まれた色素を測定することでヒトα-フェトプロテインを検出した。まず測定に使用する材料について説明する。

(1) 担体:

抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を固定化したガラスビーズを実施例1と同様にして用意した。

(2) オリゴヌクレオチド:

実施例1と同一の2種類を作成した。

(3) DNA:

実施例1と同一のものを使用した。

(4) DNAポリメラーゼ:

Taq DNAポリメラーゼ

(5) 色素を標識したオリゴヌクレオチド:

色素としてフルオレッセインを用いた。調製方法を以下に示す。

実施例1の方法に従い5'末端にアミノヘキシル基を導入した2種類のオリゴヌクレオチドを得た。pH 8.5において10倍モルのフルオレッセインイソチオシアナートを加え、室温で6時間反応させた。未反応のフルオレッセインイソチオシアナートやその分解物をセファデックスG25カラムを用いて除いた。以上の方法でフルオレッセイン標識したオリゴヌクレオ

チドを得た。

次に、ヒト α -フェトプロテインの測定法を示す。本実施例では、各種濃度のヒト α -フェトプロテインに対してどのような蛍光強度が得られるかを測定した。

まず抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を固定化したガラスビーズ1個を容器にとり、 $0 \sim 10^{-12}$ Mのヒト α -フェトプロテインを含む溶液100 μ lを加え、30分間攪拌した。10 mg/ml牛血清アルブミンを含むPBSで洗浄した後、実施例1の方法で調製したDNA標識ヒト α -フェトプロテイン抗体(抗体濃度として10 nM) 100 μ lを加え、3時間攪拌した。10 mg/ml牛血清アルブミンを含むPBS、続いて50 mM KClと1.5 mM MgCl₂を含むpH 8.3の10 mM トリス塩酸緩衝液で洗浄した。以上の操作でガラスビーズ上に捕捉したヒト α -フェトプロテインに対し、DNA標識抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を結合させた。

次に、DNAの増幅を行なった。すなわち、2

種類のフルオレッセイン標識したオリゴヌクレオチド(1 μ M)と各200 μ Mの濃度のdATP、dTTP、dGTP、dCTPと2.5 ユニットのTaq DNAポリメラーゼを含むDNA合成用緩衝液を100 μ l加えた。

次に以下の反応サイクルを30回くり返した。

- (1) 94℃に1分間保ち、DNAを一本鎖にする。
- (2) 55℃に2分間保ち、1本鎖DNAにオリゴヌクレオチドを相補的に結合させる。
- (3) 72℃に2分間保ち、DNAを合成する。

反応液を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。増幅したDNAバンドの部分に488 nmのアルゴンレーザ光を当て、出てくる520 nmの蛍光を測定した。

第2図は、各濃度のヒト α -フェトプロテインに対して得られた蛍光強度を示す。第2図より、フルオレッセイン標識したオリゴヌクレオチドを用いてDNA増幅反応を行うことで、感度よくヒト α -フェトプロテインを測定できることがわかった。

上記実施例ではオリゴヌクレオチドを標識する色素にフルオレッセインを用いたが、他に、4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール、2-オキサ1,3-ジアゾール-4-2-スルホン酸、スルホローダミン101等を導入しても同様の結果が得られた。

上記実施例ではフルオレッセインの結合したDNAを合成し、この蛍光を測定したが、DNAを検出する方法としては、電気泳動により未反応のオリゴヌクレオチドを除いた後、エチジウムブロマイド等の蛍光染料を用いてDNAを染色しても同様の結果が得られた。

〔発明の効果〕

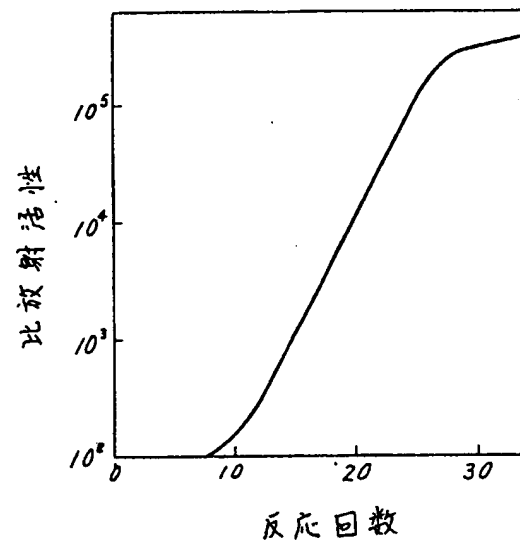
本発明によれば、DNAの増幅反応を用いているために、反応時間に対して得られる信号強度は級数的に増加する。また、フルオレッセインなど従来、酵素の活性測定には使用が難しかったが、分子吸光系数や蛍光収率の高い色素を用いることができるため、低濃度の物質を短時間で測定できる効果がある。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例におけるDNA合成反応のくり返し回数に対し得られる信号値を示す測定図、第2図は本発明の他の実施例のヒトα-フェトプロテインの測定結果を示す図である。

代理人 弁理士 小川 勝男

第 1 図



第 2 図

